Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Über die biologische Bedeutung der sauren Hefephosphatase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Winfried Kattner
aus Breslau

1968

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Über die biologische Bedeutung der sauren Hefephosphatase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Winfried Kattner
aus Breslau

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r

Referant: Priv.Doz. Dr.med. Theodor G ü n t h e r

Korreferent: Professor Dr.med. Helmut C o p e r

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 21.5.1968

Inhaltsverzeichnis

Einführung S. 5

Ergebnisse

A. Bildung und Eigenschaften der Hefephosphatasen

1. Die Bildung der Phosphatase S. 10
2. Die Lokalisation des Enzyms S. 14
3. p_H-Abhängigkeit und Substratspezifität S. 16
4. Die Wirkung von Mg-Ionen S. 19

B. Beziehungen der sauren Phosphatase zum Stoffwechsel der Hefezelle S. 19

1. Saure Phosphataseaktivität und anaerobe Gärung S. 20
2. Saure Phosphataseaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit S. 22
3. Bestimmung der in der intakten Zelle wirksamen Phosphataseaktivität S. 22
4. Saure Phosphatase und Phosphatstoffwechsel S. 25

Diskussion S. 28

Material und Methoden S. 30

Zusammenfassung S. 38

Literaturverzeichnis S. 39

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0058

Über die biologische Bedeutung der sauren Hefephosphatase

Enzyme, die die Hydrolyse von Phosphomonoestern katalysieren, sind in der Natur weit verbreitet. In Mikroorganismen und in tierischen Organen wie Leber, Niere, Knochen und Dünndarm konnten sie nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt die Muskelzelle dar, die praktisch keine Phosphomonoesterase enthält (34).

Untersuchungen über Phosphomonoesterasen der Hefen reichen bis in die Jahre 1934 - 1938 zurück. Es konnten dabei drei verschiedene Enzyme voneinander abgetrennt werden, die sich durch ihre p_H-Abhängigkeit, Substratspezifität und Metallionenaktivierbarkeit unterscheiden. Das erste Aktivitätsmaximum liegt im Sauren zwischen p_H 3,8 und 4,2. Das Enzym ist unspezifisch und spaltet Hexosemonophosphate sowie α- und ß-Glycerophosphat (1). Schaeffner und Bauer (32) fanden ein zweites Ferment mit einem Wirkungsoptimum bei p_H 6,4. Es spaltet spezifisch α-Glycerophosphat und wurde daher später, als weitere Phosphatasen in der Hefe entdeckt wurden, α-Glycerophosphatase genannt. Das Enzym ist Mg^{++} abhängig. Das p_H-Optimum der alkalischen Phosphatasen gibt Schuchardt (36) mit 6,0 - 8,8 an, Schaeffner und Krumey (33) fanden es bei 9,0. Die alkalischen Phosphatasen sind substratunspezifisch. Ihre Aktivität wird durch Mg^{++} erhöht.

An anderen Zellen z.B. E.coli gelang es inzwischen, einzelne Phosphatasen noch in ihre Isoenzyme aufzutrennen.

Obwohl die enzymatischen Eigenschaften der Hefephosphatasen aufgrund dieser Arbeiten gut bekannt waren, war ihre Funktion im Stoffwechsel der Zelle unklar. Die große Bedeutung von Phosphorsäureestern im Kohlenhydratstoffwechsel ließ daran denken, daß Phosphatasen an Aufnahme und Umsatz der Kohlenhydrate beteiligt sein könnten (7, 15, 21, 23, 30). Andere Untersucher vermuteten einen Zusammenhang mit dem Phosphatstoffwechsel der Zelle (28,31).

Kiesow und Döge (21) schreiben der von ihnen untersuchten sauren Hefephosphatase mit einem p_H-Optimum von 3,2, die sie als Hexosemonophosphatase ansprechen, eine die maximale Gärungsgröße der Zelle regulierende Funktion zu. Nach ihrer Vorstellung resultiert die stationäre Glukose-6-phosphatkonzentration in der Zelle aus der Geschwindigkeit der Zuckerphosphorylierung durch die Hexokinase und der der Dephosphorylierung durch die Hexosemonophosphatase. Bei konstanter Hexokinaseaktivität reguliere also die Hexosemonophosphatase die stationäre Glukose-6-phosphatkonzentration und damit die Gärungsgröße. Diese an Bäckerhefe gewonnene Vorstellung wurde auch an tierischen Zellen geprüft. Ascitestumorzellen, die eine hohe anaerobe und aerobe Glykolyse aufweisen, besitzen nur geringe Hexosemonophosphataseaktivität, während frisch trypsinierte Nierenzellen ohne aerobe und mit geringer anaerober Glykolyse hohe Hexosemonophosphataseaktivität zeigen. In der Gewebekultur entsteht aus dem normalen Zellstoffwechsel mit hoher Atmung ohne aerobe Glykolyse und mit geringer anaerober Glykolyse allmählich der Stoffwechsel der Tumorzellen mit niedriger Atmung und hoher anaerober und aerober Glykolyse (42). Kiesow und Döge konnten an embryonalem Nierengewebe und an ganzen Hühnerembryonen zeigen, daß während dieses Überganges die Hexosemonophosphataseaktivität der Zellkultur

langsam absinkt. Umgekehrt konnten sie nachweisen, daß während der embryonalen Entwicklung die Hexosemonophosphataseaktivität der Zellen ansteigt und die maximale Gärungsgröße abnimmt (21). Sie sehen darin eine Bestätigung ihrer Theorie.

Phosphatasen könnten jedoch auch als Bestandteil eines Systems des aktiven Zuckertransports durch die Zellmembran Einfluß auf die Aufnahme und den Umsatz der Kohlenhydrate nehmen. Seit Gottschalk (10) entdeckte, daß die Fähigkeit gewisser Weinhefen, aus Invertzuckerlösungen bevorzugt Fruktose aufzunehmen, verloren geht, wenn man die Membranen der Zellen zerstört, forderten viele Autoren eine "Permease", die die Aufnahme der Zucker in die Hefezelle katalysiert (3, 4, 37). Einige Beobachtungen sprechen dafür, daß Phosphatasen an diesem Prozeß beteiligt sind. So beobachteten Englesberg, Watson und Hoffee (7) bei Salmonella typhimurium eine reziproke Beziehung zwischen Glukosepermease- und saurer Phosphataseaktivität. Sie schlossen daraus, daß möglicherweise beide Enzyme am aktiven Zuckertransport beteiligt seien.

Die Möglichkeit, daß die Phosphatasen eine Funktion im Zuckertransport ausüben, wird von Rogers und Reithel (30) sowie von v.Hofsten und Porath (15) auch für die saure Phosphatase von E.coli, von Kuo und Blumenthal (23) für die saure Phosphatase von Neurospora crassa diskutiert. Die Experimente dieser Autoren geben allerdings keinen Hinweis auf einen solchen Zusammenhang.

Kundig und Mitarbeiter (22) fordern aufgrund ihrer Versuche an E.coli eine Phosphatase als letztes Glied in der Kette der am Zuckertransport beteiligten Enzyme. Sie isolierten ein Phosphotransferasesystem, das die Übertragung des Phosphats von Phosphoenolpyruvat auf die Zucker katalysiert. Wenn man bei E.coli durch osmotischen Schock bei 0 Grad C Enzyme von der Zelloberfläche

ablöst, so geht die Fähigkeit des Zuckertransports durch die Zellmembran verloren. Das von Kundig beschriebene Phosphotransferasesystem kann sie wiederherstellen. Es ist also am aktiven Zuckertransport beteiligt. Die Zucker würden nach dieser Vorstellung als Phosphatester aufgenommen. Da sie jedoch in der Zelle zum größten Teil in freier Form gefunden werden, ist die zusätzliche Wirkung einer Phosphatase anzunehmen.

Die Frage, ob die Phosphatasen an der Aufnahme des Orthophosphats in die Zelle beteiligt sind, wurde von Rothstein und Meier (31) untersucht. Sie fanden an Hefe keinen Zusammenhang zwischen Phosphataseaktivität und Phosphataufnahme. Auch Pauwels und Reijnen (28) fanden, wenn sie die Zellen mit Säure behandelten und dabei fast die ganze saure Phosphataseaktivität der Hefe zerstörten, keine geringere Phosphataufnahme als vor der Säurebehandlung.

Die sauren Phosphatasen der Hefe sind wie die alkalischen von E.coli (13, 14, 17, 30, 35, 40) adaptive Enzyme, d.h. ihre Bildung läßt sich durch Züchtung in phosphatreichen Medien reprimieren. Damit ist die Möglichkeit gegeben, Zellen des gleichen Stammes mit unterschiedlicher Phosphataseaktivität zu untersuchen. Suomalainen, Linko und Oura (38) fanden bei ihren Untersuchungen mit absinkender Phosphatkonzentration einen Anstieg der sauren Phosphataseaktivität auf das 6 - 11 fache.

Die Phosphatkonzentration, mit der eine maximale Repression des Enzyms zu erreichen ist, wurde von McLellan und Lampen (27) mit 40 mM/l angegeben, maximale Derepression wurde mit 0,25 mM/l erreicht. Diese Angaben beziehen sich jedoch auf die Ausgangskonzentration im Kulturmedium und berücksichtigen nicht die rasche Phosphatabnahme im Medium während der logarithmischen

Wachstumsphase. Exakte Angaben finden sich bei Weimberg und Orton (44), die den Zusammenhang zwischen saurer Phosphataseaktivität und extracellulärer Orthophosphat-, sowie intracellulärer Ortho- und Polyphosphatkonzentration untersuchten. Sie fanden eine Abhängigkeit der Phosphataseaktivität vom extracellulären Orthophosphat, während intracelluläres Ortho- und Polyphosphat keinen Einfluß auf die Enzymsynthese zu haben schienen.

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, welche Funktion die saure Phosphatase im Stoffwechsel der Hefezelle hat. Dazu mußten zunächst die Bedingungen ermittelt werden, unter denen die Hefe saure Phosphatase bildet. Literaturangaben ließen erwarten, daß das Enzym an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Das mußte überprüft werden, denn ein Enzym an der Zelloberfläche kann kaum Einfluß auf den Zellstoffwechsel nehmen. Die p_H-Abhängigkeit wurde gemessen weil man von einem Ferment des Zellstoffwechsels ein p_H-Optimum erwarten müßte, das dem im Zellinneren herrschenden p_H entspricht. Ein Ferment des Zellstoffwechsels müßte auch eine hohe Substratspezifität aufweisen. Die Aktivität wurde deshalb mit drei verschiedenen Substraten bestimmt. Die Metallionenaktivierbarkeit kann einen weiteren Hinweis auf die Funktion des Enzyms geben. Schließlich wurden vergleichend an Zellen des gleichen Stammes, jedoch mit hoher und niedriger Phosphataseaktivität, Messungen der Wachstumsgeschwindigkeit, der maximalen Gärungsgröße und der Aufnahme eines unvergärbaren Zuckers, der 2-Desoxyglukose, durchgeführt, um eine Beziehung der Phosphatase zu diesen Größen nachzuweisen. Die Bestimmung der intracellulären Phosphatfraktionen während des Wachstums unter Phosphatmangel erbrachte einen Hinweis auf die Regulation der Synthese der sauren Phosphatase und damit ebenfalls auf ihre Funktion.

Ergebnisse

A. Bildung und Eigenschaften der Hefephosphatasen

1. Die Bildung der Phosphatase

Um Zellen mit stark unterschiedlicher Phosphataseaktivität zu erhalten, mußte zunächst die Phosphatkonzentration im Medium und die Wachstumszeit für maximale Phosphatasebildung bestimmt werden.

Unter den gewählten Bedingungen (s. Methode) erreichte die Phosphataseaktivität phosphatarm und aerob gezüchteter Zellen nach etwa 18 Stunden ihren maximalen Wert von 51,5 µM PNP/mg Prot.· h. Die Aktivität der phosphatreich gezüchteten Parallelansätze betrug 4,8 µM PNP/mg Prot.·h. Das entspricht einem Anstieg der Aktivität auf das 10-fache. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 5 Versuchen. Anfangs wurde, in Anlehnung an McLellan und Lampen (27), eine Phosphatkonzentration von 60 mM/l zur Repression und von 0,24 mM/l zur Derepression der Phosphatase eingesetzt. Die schlechte Reproduzierbarkeit der Derepression veranlaßte uns jedoch, bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen, in Parallelansätzen neben der Phosphataseaktivität auch die Abnahme des Orthophosphats im Medium während des Wachstums zu verfolgen. Abb.1

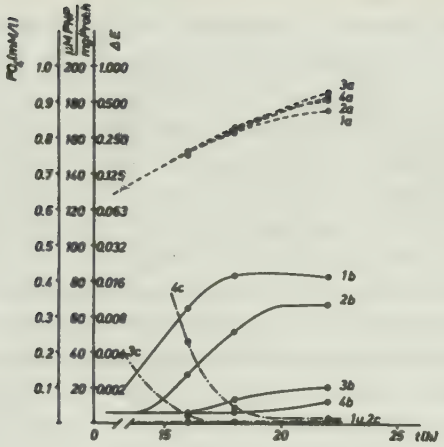

Abb.1 Aerobes Wachstum und Phosphataseaktivität bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen.

Hefezellen wurden bei 30 Grad C aerob gezüchtet. Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung bei 405 nm verfolgt. Bestimmung der Phosphataseaktivität an intakten Zellen mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bei 37 Grad C. Phosphatbestimmung im Medium nach Fiske u. Subbarow. Den Medien wurden folgende Phosphatmengen zugesetzt:

1	10^{-4} M/l	a Wachstum
2	$2 \cdot 10^{-4}$ M/l	b Phosphataseaktivität
3	$4 \cdot 10^{-4}$ M/l	c Extracelluläre
4	$6 \cdot 10^{-4}$ M/l	Phosphatkonzentration

Dabei zeigte sich, daß sehr geringe Phosphatkonzentrationen genügen, um die Bildung der Phosphatase zu unterdrücken. Bereits bei einer Ausgangskonzentration von 0,1 mM/l sinkt während der praelogarithmischen Wachstumsphase die Phosphataseaktivität der Zellen auf den Wert von ca. 5 uM PNP/mg Prot.·h ab. Bei der von McLellan und

Lampen angegebenen Konzentration ist also noch nicht mit einer Derepression des Enzyms zu rechnen. Mit Einsetzen des logarithmischen Wachstums nimmt die Phosphatkonzentration im Medium rasch ab, bis bei einem Wert von 0,05 mM/l die Bildung der sauren Phosphatase beginnt. Die Aktivität steigt dann rasch auf hohe Werte an. Geht man von höheren Phosphatkonzentrationen im Medium aus, so erhält man eine zeitliche Verschiebung der Induktion. Ihr Beginn ist jedoch wieder durch das Absinken der extracellulären Phosphatkonzentration unter den Wert von 0,05 mM/l markiert. Die Aktivität erreicht unter diesen Bedingungen geringere Werte, weil sich die Zellen inzwischen nicht mehr in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen finden sich im Prinzip gleiche Verhältnisse. Abb.2.

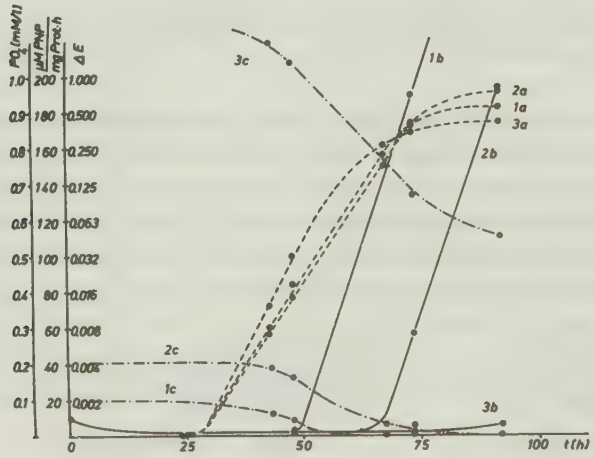

Abb.2 Anaerobes Wachstum und Phosphataseaktivität bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen.

Versuchsbedingungen wie im Versuch der Abbildung 1. Anaerobe Verhältnisse wurden durch Zusatz von 10^{-3} M/l KCN geschaffen. Die Phosphatkonzentrationen im Medium betrugen:

1	10^{-4} M/l	$3 \cdot 10^{-3}$ M/l
2	$2 \cdot 10^{-4}$ M/l	

Die Phosphataseaktivität erreicht hier allerdings das 3 - 4-fache der aerob erreichten Werte. Die Ursache ist in der unter anaeroben Verhältnissen niedrigeren Konzentration des intracellulären Polyphosphats zu suchen. Diese Frage wird später anhand der Bestimmung der intracellulären Phosphatfraktionen noch diskutiert.

Die alkalische Phosphatase der Hefe ist ebenfalls, wenn auch in weit geringerem Maße, reprimierbar. Abb.3. Zu diesem Ergebnis kommen auch McLellan und Lampen (27).

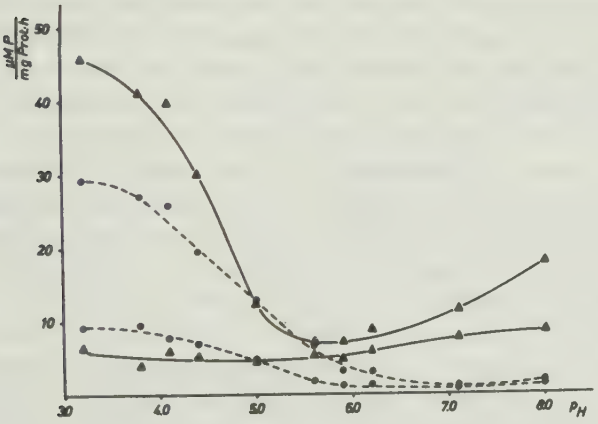

Abb.3 Repression der Hefephosphatasen.

Die Abbildung zeigt die p_H-Abhängigkeit reprimierter und dereprimierter Phosphatasen von intakten Zellen und Zellextrakten. Die Zellen wurden in Medien gezüchtet, die $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ und $6 \cdot 10^{-2}$ M/l Phosphat enthielten. Die Zellextrakte wurden durch Aufschluß der Zellen im Gasdruckhomogenisator und Zentrifugation bei 100 000 g gewonnen. Der Über-

stand wurde zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Bestimmung der Phosphataseaktivität mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat in Veronal-Acetatpuffer bei 37 Grad C. Gemessen wurde das abgespaltene Phosphat nach Fiske und Subbarow.
○------○ intakte Zellen, Phosphatasen reprimiert
●-----● intakte Zellen, Phosphatasen dereprimiert
△———△ Zellextrakt, Phosphatasen reprimiert
▲———▲ Zellextrakt, Phosphatasen dereprimiert

2. Die Lokalisation des Enzyms

Wenn die saure Hefephosphatase Bestandteil eines aktiven Zuckertransportsystems der Zellmembran wäre, so sollte sie an der Zelloberfläche lokalisiert sein. Der Nachweis ihrer Lokalisation ist deshalb von großer Bedeutung. In der Literatur finden sich voneinander abweichende Angaben. Suomalainen, Linko und Oura (38) fanden in frischen Cytolysaten eine höhere Enzymaktivität als in intakten Zellen. Sie schlossen daraus, daß etwa 2/3 des Enzyms an der Zelloberfläche und 1/3 im Zellinneren lokalisiert seien. Schmidt und Mitarbeiter (35) fanden nach Aufschluß der Zellen im Glasperlenhomogenisator keine höhere Aktivität als an intakten Zellen. Heredia, Yen und Sols (13) schlossen aus der Beobachtung, daß sich in Extrakten von Hefezellen, die vor der Extraktion mit 0,1 n HCl behandelt worden waren, kaum noch saure Phosphataseaktivität nachweisen läßt, während die alkalische unbeeinflußt bleibt, auf eine Lokalisation der sauren Phosphatase an der Zelloberfläche.

Tonino und Steyn-Parvé (39) wiesen die saure Phosphataseaktivität der Hefe in Zellwandpraeparationen nach. Hieraus und aus der Beobachtung, daß Phosphatester, die die Zellwand nicht passieren können, von intakten Zellen und Zellaufschlüssen mit gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert werden, schlossen auch diese Autoren auf eine

Lokalisation der sauren Phosphatase an der Zelloberfläche. Als wertvolle Methode zum Studium auf der Zellmembran lokalisierter Enzyme hat sich die Praeparation von Protoplasten durch Behandlung der Zellwand mit Enzymen von Helix pomatia (9) erwiesen. McLellan und Lampen (27) gelang es auf diese Weise, 89 % der sauren Phosphataseaktivität von der Zelloberfläche von Saccharomyces cerevisiae abzulösen. Die Protoplasten sezernierten die neugebildete Phosphatase ins Medium. Weimberg und Orton (43) bestätigten diese Beobachtung an Saccharomyces mellis.

In unseren Versuchen war die saure Phosphataseaktivität von Zellaufschlüssen, die im Gasdruckhomogenisator oder durch Einbringen der Hefe in flüssige Luft gewonnen wurden, nicht höher als die intakter Zellen. Allerdings läßt sich damit nicht beweisen, daß die saure Phosphatase ausschließlich auf der Zelloberfläche vorkommt, da das Enzym bei diesen Aufschlußverfahren nicht ganz stabil ist. Tab.1.

Aufschluß im Gasdruckhomogenisator

Wachstumszeit	Akt.vor Aufschl.	Akt.nach Aufschl.
14 h	13,10	6,62
18 h	82,40	72,80
37 h	74,50	70,40

Aufschluß durch flüssige Luft

Wachstumszeit	Akt.vor Aufschl.	Akt.nach Aufschl.
15 h	11,42	2,35
18 h	44,80	43,60
36 h	39,95	42,00

Tab.1 Phosphataseaktivität bei p_H 4,0 vor und nach Aufschluß der Zellen in μM PNP / mg Prot.·h.

α-Glycerophosphatase und alkalische Phosphatase lassen sich nur in Zellaufschlüssen nachweisen. Intakte Zellen zeigen keine Aktivität. Man kann daraus schließen, daß diese Enzyme nur im Zellinneren vorkommen (Abb.3). Elektronenoptische Untersuchungen histochemisch praeparierter Zellen (11) zeigen, daß der größte Teil der sauren Phosphatase an der Zelloberfläche liegt. Das Enzym wird offenbar im Zellinneren synthetisiert und sekundär an die Zelloberfläche gebracht, wo es sich anhäuft. Im Zellinneren findet sich saure Phosphatase in lysosomenartigen Partikeln. Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme mit saurem p_H-Optimum und geringer Substratspezifität. Ihre Funktion ist noch umstritten.

3. p_H-Abhängigkeit und Substratspezifität

Von einem Enzym, das Einfluß auf den Zellstoffwechsel nehmen kann, sollte man ein Wirkungsoptimum erwarten, das dem physiologischen p_H im Zellinneren entspricht. Der intracelluläre p_H der Hefe wurde von Holzer und Lynen (16) mit 5 - 6 angegeben. Es war daher wichtig, die p_H- Abhängigkeit des Ferments in vitro zu bestimmen. Die ersten Angaben über die p_H-Optima der Hefephosphatasen (1, 32, 33, 36) wurden inzwischen von vielen Autoren bestätigt (13, 28, 35, 38, 39). Hiermit übereinstimmend fanden wir an dem von uns verwendeten Hefestamm ein Aktivitätsoptimum bei p_H 3,4 (Abb.4), ein zweites bei p_H 6,0, das nur bei Verwendung von α-Glycerophosphat als Substrat deutlich wurde (Abb.5), und ein drittes zwischen p_H 8,0 und 9,0. Die Werte hängen in geringem Maße von der Art des verwendeten Puffers ab.

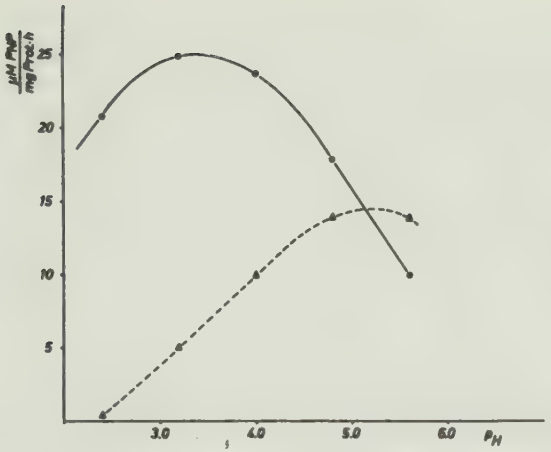

Abb.4 p_H-Abhängigkeit der sauren Hefephosphatase und Einfluß von 8 10^{-2} M/l Mg^{++} auf die Aktivität.

Die Phosphataseaktivität intakter dereprimierter Zellen wurde mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bei 37 Grad C gemessen.

▲- - - - -▲ + Mg ⊙————⊙ - Mg

Die Bestimmung der p_H-Optima wurde mit drei verschiedenen Substraten, mit p-Nitrophenylphosphat, 2-Desoxyglukose-6-Phosphat und α-Glycerophosphat, durchgeführt, um aus der Substratspezifität Schlüsse auf die Funktion der sauren Phosphatase ziehen zu können. Abb.5.

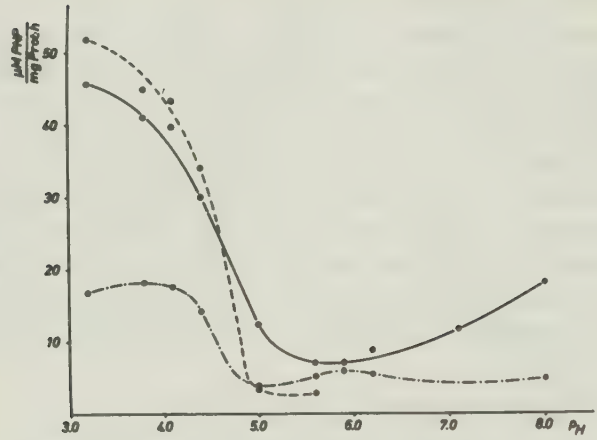

Abb.5 Substratspezifität der Hefephosphatasen.

Die Abbildung zeigt die Aktivität eines Zellextrakts, der wie im Versuch der Abbildung 3 gewonnen wurde, mit 3 verschiedenen Substraten.

●——● p-Nitrophenylphosphat
○- - - - -○ 2-Desoxyglukose-6-Phosphat
◐—·—·—·◐ d-Glycerophosphat

2-Desoxyglukose-6-Phosphat und p-Nitrophenylphosphat werden im sauren Bereich mit gleicher Geschwindigkeit gespalten. d-Glycerophosphat wird etwa halb so schnell hydrolysiert. Das Analoge fand Rothstein (31). Die saure Hefephosphatase zeigt also keine Substratspezifität.

4. Die Wirkung von Mg^{++} -Ionen

Während die alkalische Phosphatase der Hefe Mg^{++} -aktivierbar (33) und die α-Glycerophosphatase ohne Mg^{++} inaktiv ist (32), wird die saure Phosphatase durch höhere Mg^{++} -Konzentrationen stark gehemmt. H. und E. Albers (1) fanden bei einer Mg^{++} -Konzentration von 0,07 M/l 86 %, bei 0,01 M/l 35 % und bei 0,001 M/l 6 % Hemmung des Enzyms mit Hexosediphosphat als Substrat. Schmidt und Mitarbeiter (35) gaben 5 % Hemmung durch 0,01 M/l Mg^{++} mit ß-Glycerophosphat als Substrat an.

Um diese Angaben für unseren Hefestamm zu überprüfen, untersuchten wir die Wirkung einer Mg^{++} -Konzentration von 0,08 M/l auf die Spaltung von p-Nitrophenylphosphat bei verschiedenem p_H (Abb.4). Die saure Phosphatase wird durch diese Konzentration vollständig gehemmt, während zum Alkalischen hin eine zunehmende Aktivierung eintritt. Bei einer Konzentration von 0,008 M/l wurden bei p_H 4,0 dagegen gleiche p-Nitrophenylphosphatmengen gespalten wie ohne Mg^{++} - Zusatz. Die von uns verwendeten Mg^{++} -Konzentrationen, die für die Aktivierung der alkalischen Phosphatase nötig sind, hatten also keinen Einfluß auf die saure Phosphatase.

B. Beziehungen der sauren Phosphatase zum Stoffwechsel der Hefezelle

Nach Überprüfung der Eigenschaften der sauren Hefephosphatase sollte untersucht werden, ob sich an Zellen des gleichen Stammes mit unterschiedlicher Phosphataseaktivität, wie man sie durch Züchtung in phosphatarmem und phosphatreichem Medium erhält, auch unterschiedliches Stoffwechselverhalten nachweisen läßt.

Nach Kiesow (18) besteht zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der Gärungsgröße von Kulturhefen eine enge

Beziehung. Bringt man Hefe aus einfacher Salzlösung in Bierwürze, so beobachtet man neben dem schnelleren Wachstum einen gleichzeitigen Anstieg der anaeroben Glykolyse. Diese Kopplung zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und anaerober CO_2-Bildung kommt auch darin zum Ausdruck, daß Vitamin K 3 Wachstum und Gärung der Kulturhefen in gleichem Maße hemmt.

Wir verfolgten deshalb Phosphataseaktivität, anaerobe Glykolyse und Wachstumsgeschwindigkeit bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen im Medium.

1. Saure Phosphataseaktivität und anaerobe Gärung

Der $Q_{CO_2}^{N_2}$ steigt, wie die Abbildung 6 zeigt, zunächst rasch an und erreicht während der logarithmischen Phase, in der die Zellen am schnellsten wachsen, seinen höchsten Wert, um mit abnehmender Wachstumsgeschwindigkeit auf den Ausgangswert zurückzukehren. Die in Abhängigkeit von der extracellulären Orthophosphatkonzentration zu verschiedenen Zeiten einsetzende Bildung der sauren Phosphatase hat keinen Einfluß auf die Gärungsgröße. Man erkennt aber auch, daß der Anstieg der Phosphataseaktivität mit dem Absinken des $Q_{CO_2}^{N_2}$ zeitlich zusammenfallen kann, wenn bei hoher Ausgangskonzentration des Orthophosphats im Medium die Bildung der Phosphatase erst am Ende der logarithmischen Phase einsetzt. So kann eine reziproke Beziehung zwischen maximaler Gärungsgröße und saurer Phosphataseaktivität vorgetäuscht werden (Abb.6, Kurven 3 b u. c).

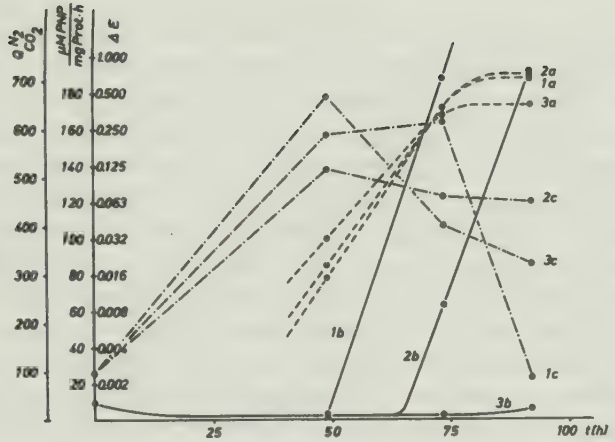

Abb.6 Phosphataseaktivität und anaerobe CO_2-Bildung während des Wachstums bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen.

Das Wachstum, die Phosphataseaktivität und die anaerobe CO_2-Bildung anaerob wachsender Hefe wurden zu verschiedenen Zeiten bestimmt.

Bestimmung der Zellmasse durch Trübungsmessung bei 405 nm. Die Phosphataseaktivität der intakten Zellen wurde bei 37 Grad C mit p-Nitrophenylphosphat gemessen. Die anaerobe CO_2-Bildung wurde manometrisch bei 30 Grad C mit N_2 + 5 % CO_2 als Gasphase gemessen.
$Q_{CO_2}^{N_2}$ = mm^3 CO_2 / mg Prot.·h.
Die Wachstumsmedien enthielten folgende Phosphatkonzentrationen:

1	10^{-4} M/l	a	Wachstum
2	$2 \cdot 10^{-4}$ M/l	b	Phosphataseaktivität
3	10^{-3} M/l	c	anaerobe CO_2-Bildung

2. Saure Phosphataseaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit

Züchtet man Hefezellen in Parallelversuchen bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen, so wachsen die Zellen in allen Ansätzen gleich schnell (Abb.1 u. 2). Die geringen Unterschiede liegen im Fehlerbereich der Methode. Die Zellmasse nimmt nach einer Induktionsphase exponentiell zu, bis nach Erreichen einer maximalen Zellkonzentration das Wachstum aufhört. Unter aeroben Bedingungen beträgt die Zeit zwischen zwei Teilungen etwa 2, unter anaeroben Bedingungen etwa 5 Stunden. Während der praelogarithmischen Wachstumsphase mißt man bei allen Phosphatkonzentrationen eine Phosphataseaktivität der Zellen von 5 µM PNP/mg Prot.·h. Mit Einsetzen des exponentiellen Wachstums wird das im Medium vorhandene Orthophosphat rasch verbraucht. Die Bildung der Phosphatase beginnt, und zwar umso eher, je niedriger die ursprüngliche Phosphatkonzentration war. Der Anstieg der Aktivität erfolgt rasch. Setzt die Bildung der Phosphatase spät ein, so befinden sich die Zellen inzwischen nicht mehr in der logarithmischen Wachstumsphase, es wird nicht mehr genügend Enzymprotein gebildet und die Aktivität erreicht nicht mehr so hohe Werte. Während der logarithmischen Wachstumsphase erhalten wir also in diesem Experiment Zellen mit stark unterschiedlicher saurer Phosphataseaktivität bei gleicher Wachstumsgeschwindigkeit.

3. Bestimmung der in der intakten Zelle wirksamen Phosphataseaktivität

Wenn die saure Phosphatase in der Zelle wirksam ist, so muß sich eine Hexosemonophosphataseaktivität nachweisen lassen, die der in Zellaufschlüssen gemessenen sauren Phosphataseaktivität entspricht.

Kiesow (20) hat eine Methode angegeben, mit der die Hexosemonophosphataseaktivität in der intakten Zelle gemessen

werden kann. Suspendiert man Hefezellen in glukosefreiem Medium, dem 2-Desoxyglukose zugesetzt wurde, so wird dieser Zucker wie Glukose aufgenommen und an der Hexokinase phosphoryliert, ohne jedoch weiter umgesetzt zu werden. Die intracelluläre Konzentration des entstehenden 2-Desoxyglukose-6-Phosphats strebt einem Gleichgewichtszustand zu, der aus der Summe der Geschwindigkeiten von Zuckerphosphorylierung und -dephosphorylierung resultiert. Entzieht man der Hexokinasereaktion das ATP, indem man die Atmung unterbindet oder unwirksam macht, wobei die intracelluläre ATP-Konzentration praktisch auf 0 absinkt (24,41), so erscheint der Zucker wieder im Medium. Die Anfangsgeschwindigkeit der Zuckerabgabe soll ein Maß für die Hexosemonophosphataseaktivität sein.

Führt man dieses Experiment an Zellen mit reprimierter und dereprimierter saurer Phosphatase durch, so findet man nur wenig unterschiedliche Hexosemonophosphataseaktivitäten (Abb.7). Dieser Unterschied kann nur durch andere Phosphatasen, nicht aber durch die saure Phosphatase hervorgerufen werden. Man hätte sonst bei dereprimierten Zellen eine mehr als 10 mal höhere Aktivität feststellen müssen.

Daraus ist zu schließen, daß die saure Phosphatase nicht in der lebenden Zelle wirkt.

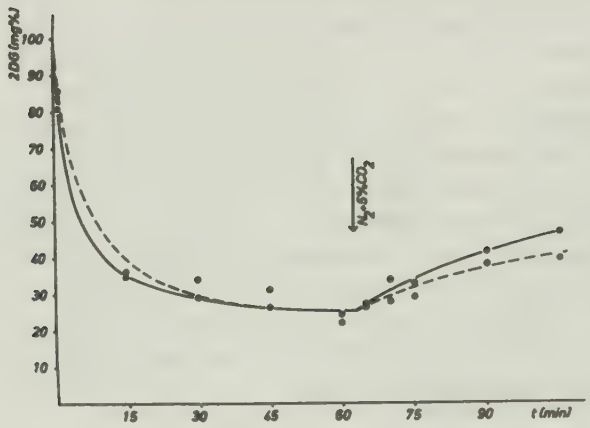

Abb.7 Hexosemonophosphataseaktivität phosphatarm und phosphatreich gezüchteter Zellen in vivo.

Die Zellen wurden 18 Stunden in Medien gezüchtet, die 10^{-4} bzw. 10^{-3} M/l Phosphat enthielten, dann gewaschen und in Gegenwart von Glukose und Mg^{++} eine Stunde gleichmäßig mit Phosphat beladen. Der Gehalt an säurelöslichem Phosphat betrug bei den dereprimierten Zellen 0,4, bei den reprimierten 0,294 M Phosphat pro Liter Zellen. Die Phosphataseaktivität wurde mit 103 µM PNP/mg Prot.·h für die dereprimierten und mit 6,35 µM PNP/mg Prot.·h für die reprimierten Zellen bestimmt.

Die Zellen wurden in Suspensionen, die 12,0 bzw. 13,2 mg Prot./ml enthielten, bei 20,5 Grad C mit 2-Desoxyglukose beladen. Nach 60 Minuten wurde die Gasphase gegen N_2 + 5 % CO_2 ausgewechselt und das Wiedererscheinen des Zuckers im Medium gemessen. Enzymatische 2-Desoxyglukosebestimmung mit dem Boehringer-Testsatz zur Blutzuckerbestimmung.

●———● Phosphatase dereprimiert

○- - - -○ Phosphatase reprimiert

4. Saure Phosphatase und Phosphatstoffwechsel

Während die saure Phosphatase der Hefe auf die intracelluläre Anhäufung von Phosphaten keinen Einfluß hat (28,31), wird umgekehrt ihre Bildung von Orthophosphaten im Medium gesteuert (13, 27, 35, 38). Weimberg und Orton (44) verfolgten die Phosphataseaktivität sowie die intracelluläre Ortho- und Polyphosphatkonzentration während des Wachstums mit und ohne Phosphat im Medium. In Gegenwart von Phosphat und einer Energiequelle werden in wachsenden und in ruhenden Zellen Polyphosphate angehäuft. Die Bildung oder der Abbau von saurer Phosphatase ist dagegen an das Wachstum d.h. an die Proteinsynthese gebunden. Man kann also Zellen erhalten, die sowohl reich an Polyphosphaten als auch an saurer Phosphatase sind, wenn man dereprimierte Zellen unter Bedingungen, unter denen sie nicht wachsen, Polyphosphat anhäufen läßt. Weimberg und Orton schließen daraus, daß die Synthese der sauren Phosphatase und der Abbau der Polyphosphate voneinander unabhängige Vorgänge sind, die allerdings unter physiologischen Bedingungen parallel zueinander verlaufen. Die intracelluläre Orthophosphatkonzentration wird weitgehend konstant gehalten, so daß sie die Bildung der sauren Phosphatase kaum beeinflussen kann. Nach Weimberg und Orton soll also die extracelluläre Orthophosphatkonzentration allein die Bildung der sauren Phosphatase kontrollieren. Man kann sich aber nicht vorstellen, wie extracelluläres Orthophosphat als Corepressor mit dem vom Regulatorgen gebildeten Repressor reagieren soll, um das Operon zu reprimieren.

Wir bestimmten deshalb die extracelluläre Phosphat- sowie die intracelluläre Ortho- und Polyphosphatkonzentration unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen und stellten die Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von diesen drei Größen dar (Abb.8).

Unter aeroben Bedingungen verlaufen alle drei Kurven gleichsinnig. Welche der drei Substanzen die Bildung der sauren Phosphatase steuert, läßt sich danach nicht entscheiden.

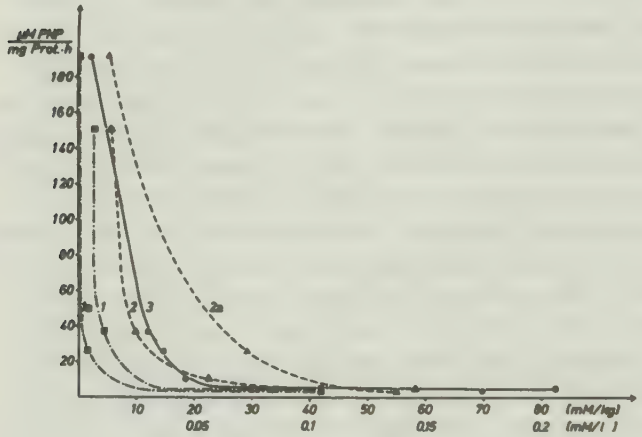

Abb.8 Saure Phosphataseaktivität in Abhängigkeit vom extracellulären Phosphat, intracellulären Orthophosphat und intracellulären Polyphosphat unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen.

Die Zellen wurden in einem Kulturmedium, dem 50 mM/l KH_2PO_4 zugesetzt wurden, 18 Stunden aerob bzw. 48 Stunden mit Zusatz von 1 mM/l KCN gezüchtet, dann gewaschen und in frischem Wachstumsmedium, das nur noch ca. 0,1 mM/l PO_4 enthielt, aerob bzw. anaerob (mit KCN) weitergezüchtet. Phosphataseaktivität A (µM PNP/mg Prot.·h), extracelluläres Phosphat und intracelluläres Ortho- und Polyphosphat wurden nach verschiedenen Zeiten bestimmt. Die Phosphataseaktivität wurde an intakten Zellen mit p-Nitrophenylphosphat bei p_H 4,0 und 37 Grad C ermittelt. Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow (8). Intracelluläres Ortho- und

Polyphosphat wurden nach Weimberg und Orton (44) bestimmt.
Proteinbestimmung nach Lowry et al. (25).

—·—·—·— Extracelluläres Phosphat
1 aerob, 1a anaerob
- - - - - - - Intracelluläres Orthophosphat
2 aerob, 2a anaerob
———— Intracelluläres Polyphosphat
3 Helle Symbole: aerob, dunkle Symbole: anaerob.

Führt man jedoch die Phosphatverarmung im Vergleich dazu unter anaeroben Bedingungen durch, so zeigen sich Unterschiede. Die intracelluläre Orthophosphatkonzentration liegt anaerob höher als aerob (26). Wir fanden in unseren Versuchen anaerob einen 4 - 5 mal so hohen Wert wie aerob. Die Konzentration des intracellulären Polyphosphats, das der Zelle als Phosphatspeicher dient, ist anaerob niedriger als aerob. Die Abb.8 zeigt, daß bei gleicher Phosphataseaktivität aerob und anaerob unterschiedliche extra- und intracelluläre Orthophosphatkonzentrationen gemessen werden. Die intracelluläre Polyphosphatkonzentration ist jedoch bei gleicher Phosphataseaktivität unter aeroben und anaeroben Bedingungen die gleiche. Wie in einer vorangehenden Arbeit bereits mitgeteilt wurde (12), ist daher die intracelluläre Polyphosphatfraktion für die Steuerung der sauren Phosphatase verantwortlich.

Diskussion

Die mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß die saure Phosphatase der Hefe die Gärungsgröße und die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen nicht beeinflußt. Der $Q_{CO_2}^{N_2}$ ändert sich nur mit der Wachstumsphase. Er steht in keiner Beziehung zur sauren Phosphataseaktivität. Die Zellvermehrung einer Hefekultur verläuft wie die von Bakterienkulturen in verschiedenen Phasen. Auf eine Latenzphase, während der sich die Zellen nicht vermehren, folgt eine Beschleunigungsphase, auf sie die logarithmische Phase, in der die Zellzahl exponentiell zunimmt. Es folgt die Verzögerungsphase, die in die stationäre Phase übergeht. Der $Q_{CO_2}^{N_2}$ erreicht in der logarithmischen Phase seinen höchsten Wert und kehrt in der stationären Phase auf den Ausgangswert zurück.

Eine Wirkung der sauren Phosphatase innerhalb der normalen Zelle ist kaum möglich. Das in vitro gemessene p_H-Optimum liegt bei 3,4. Bei dem im Zellinneren herrschenden p_H von 5,0 - 6,0 (16) ist in der Zelle das Enzym daher inaktiv.

Wie die Literaturangaben bereits erwarten ließen, ist die saure Phosphatase der Hefe an der Zelloberfläche lokalisiert. Nur geringe Mengen neugebildeten Enzyms finden sich im Zellinneren von Membranen umgeben in Lysosomen ähnlichen Partikeln ehe sie an die Zelloberfläche gebracht werden. Ob Phosphatester freien Zutritt zu dieser Phosphatase im Zellinneren haben, ist fraglich. Lysosomen, die neben anderen hydrolytischen Enzymen saure Phosphatase enthalten, zeigen nach de Duve (6) kaum Phosphataseaktivität, solange ihre Membranen nicht zerstört werden.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß die saure Phosphatase in der Zelle nicht wirkt, erbringt die Bestimmung der intra-

cellulären Hexosemonophosphataseaktivität mit der 2-Desoxyglukose-Methode. Trotz großer Aktivitätsunterschiede der sauren Phosphatase werden in der Zelle fast gleiche Hexosemonophosphataseaktivitäten gemessen.

Aus diesen Beobachtungen ist der Schluß zu ziehen, daß die externe reprimierbare saure Phosphatase der Hefe, wie auch Heredia, Yen und Sols (13) annehmen, die Aufgabe hat, unter Bedingungen des Orthophosphatmangels Phosphatester des Mediums zu spalten und der Zelle als Phosphatquelle nutzbar zu machen. Das Wirkungsoptimum der sauren Hefephosphatase von p_H 3,4 entspricht den Lebensbedingungen der Hefe, die durch Austausch von H-Ionen gegen K-Ionen den p_H ihres Milieus zum Sauren hin verschiebt. Damit übereinstimmend liegt das Wirkungsoptimum der reprimierbaren Phosphatase von Escherichia coli den Lebensbedingungen dieser Darmbakterien entsprechend im Alkalischen (40).

Die Bedeutung der sauren Hefephosphatase wird auch aus der Steuerung ihrer Synthese ersichtlich. Während des Wachstums unter Orthophosphatmangel werden zunächst die intracellulär angehäuften Polyphosphate abgebaut. Dadurch wird die Repression der sauren Phosphatase aufgehoben. Sie wird synthetisiert und auf der Zelloberfläche angereichert. Dort spaltet sie Phosphatester des Mediums und erschließt damit neue Phosphatquellen.

Die Bedeutung der oberflächengebundenen reprimierbaren Phosphatasen wäre danach die Bereitstellung von Phosphat aus dem Medium, damit in der Zelle eine für Wachstum und Regulation des Zellstoffwechsels (vgl. Pasteur- und Crabtree-Effekt) ausreichende Phosphatkonzentration gewährleistet wird.

Material und Methoden

Zellmaterial

Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit früheren Ergebnissen wurde Germaniahefe Stamm A der Norddeutschen Hefeindustrie Hamburg gewählt. Die Hefe wurde in der Regel 1 - 3 Wochen nach der Herstellung verarbeitet. Die Phosphataseaktivität dieser ruhenden Zellen bei p_H 4,0 lag zwischen 9 und 26 µM PNP/mg Prot.·h und nahm während der Lagerung nur geringfügig zu (Tab.2).

Tage nach der Herstellung	14	23	28
µM PNP/mg Prot.·h	9,46	12,92	14,37

Tab.2 Änderung der Phosphataseaktivität während der Lagerung.

Reagenzien

2-Desoxyglukose-6-phosphat wurde nach der von Kiesow (21) angewendeten Methode hergestellt. Alle übrigen Reagenzien waren von handelsüblicher analysenreiner Qualität.

Züchtung der Zellen

Die im Kühlschrank bei 4 Grad C aufbewahrte Hefe wurde zur Züchtung durch Waschen mit bidestilliertem Wasser auf der Zentrifuge weitgehend von den immer vorhandenen Bakterien befreit. Je ein Tropfen einer 0,1 %igen Zellsuspension wurde implantiert.

Gezüchtet wurde in Erlenmeyerkolben bei 30 Grad C und stetiger Durchströmung mit Luft. Die Kolben wurden intermittierend bewegt. Die Reinheit der Kulturen wurde vor Versuchsbeginn jeweils im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Das Kulturmedium hatte in Anlehnung an Chung und Nickerson (5) folgende Zusammensetzung:

3,00 g $(NH_4)_2SO_4$
0,25 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,25 g $CaCl_2$
1.00 g Glycin
Aqua bidest. ad 1 000

KH_2PO_4, KCl, Glukose, Hefeextrakt und Antibiotika wurden, wie nachfolgend angegeben, zugesetzt.

Der p_H wurde mit HCl auf 5,2 eingestellt.

Die jeweilige Phosphatkonzentration ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Bei aeroben Versuchen wurden 2 %, bei anaeroben 5 - 8 % Glukose zugesetzt.

Wachstumsfaktoren enthielt das Medium in Form von Hefeextrakt Difco. Der Phosphatgehalt des Hefeextrakts betrug 0,237 mM/g und wurde bei den einzusetzenden Phosphatkonzentrationen berücksichtigt.

Zur Unterdrückung von Bakterienwachstum enthielt das Medium 15 mg Penicillin G Na, 25 mg Streptomycinsulfat und 5 mg Polymyxin B pro Liter.

Anaerobe Verhältnisse wurden durch Zusatz von 1 mM/l KCN geschaffen. Unter diesen Bedingungen wurde das Medium, um den p_H konstant zu halten, mit 0,05 M/l Succinat p_H 5,2 gepuffert.

Die externe saure Phosphataseaktivität mancher Hefen, wie z.B. Saccharomyces mellis, ist mit 0,5 M/l KCl leicht auswaschbar (45). Auch an unserem Material fanden wir, wenn die Zellen in 0,15 m KCl gewaschen und resuspendiert wurden,

einen Aktivitätsverlust von 75 % in 8 Stunden. Die KCl-Konzentration der Medien wurde deshalb mit 5 mM/l niedrig gehalten. Zum Waschen der Zellen wurde kaltes Wasser verwendet.

Bestimmung der Zellmasse

Die Bestimmung der Zellmasse in den Kulturen erfolgte durch 20 min. Zentrifugation in Haematokritröhrchen bei 1 600 g oder durch Trübungsmessung im Photometer Eppendorf bei 405 nm.

Proteinbestimmung

Protein wurde nach 30 min. Digerieren in 1 n NaOH bei 80 Grad C nach Lowry et al. (25) bestimmt.

Aufschließen der Zellen

Zellaufschlüsse wurden durch zweimalige Passage des Gasdruckhomogenisators nach Ribi bei 30 000 PSI und 15 Grad C oder durch 5 maliges Einbringen der Zellen in flüssige Luft gewonnen. Sollten lösliche Enzympraeparationen eingesetzt werden, so wurde das im Gasdruckhomogenisator gewonnene Homogenat durch 30 min. Zentrifugation bei 100 000 g in der Spinco-Ultrazentrifuge von den Zelltrümmern befreit.

Bestimmung der Phosphataseaktivität

Die Phosphataseaktivität wurde in der Regel mit p-Nitrophenylphosphat in Anlehnung an das Verfahren von Andersch und Szczypinski (2) bestimmt.
Der Ansatz enthielt:

0,1 ml Zellsuspension oder Enzympraeparation
0,1 ml 0,1 m Substrat + 0,01 m $MgSO_4$
0,3 ml 0,05 m Citrat- oder Veronal-Acetatpuffer

Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, die Temperatur 37 Grad C. Als Leerwert diente jeweils ein Ansatz, dem das Enzym nach dem Stoppen der Reaktion zugesetzt wurde. Die Reaktion wurde mit 5,0 ml 0,05 n NaOH gestoppt und die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols bei 405 nm gemessen. Die Aktivität mit anderen Substraten wurde durch die Bestimmung des freigesetzten Phosphats nach Fiske und Subbarow (8) ermittelt. Die Reaktion wurde in diesen Fällen mit 0,5 ml 15 %iger Trichloressigsäure gestoppt (Protokoll 1).

Protokoll 1

1,0 ml einer 1 %igen Zellsuspension wurde mit 10 ml Wasser verdünnt. 0,1 ml der Verdünnung setzten wir zur Bestimmung der Phosphataseaktivität ein.
Inkubation 30 Minuten.
Messung der Extinktion im Photometer Eppendorf.
Schichtdicke d = 1 cm
Wellenlänge λ = 405 nm
Extinktion E = 0,051
Der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol ist bei 400 nm = $18{,}8 \cdot 10^{-6}$ cm^2/Mol.
Die im Ansatz enthaltene Proteinmenge hat also 0,0304 µM PNP/h freigesetzt.

0,2 ml der 1 %igen Zellsuspension wurden in 1,0 ml 1 n NaOH gegeben und 30 Minuten bei 80 Grad C aufgelöst. In 0,2 ml davon bestimmten wir das Protein nach Lowry et al. (25).
Messung der Extinktion im Photometer Eppendorf.
Schichtdicke d = 1 cm
Wellenlänge λ = 578 nm
Extinktion E = 0,129

Eine Extinktionsänderung von 0,110 entspricht 20 γ Protein im Ansatz.
Der Ansatz zur Bestimmung der Phosphataseaktivität enthielt also 6,4 γ Protein.
Die spezifische Aktivität betrug demnach
4,74 µM PNP/mg Prot.·h.

Messung der Gärung

Die anaerobe CO_2-Bildung wurde manometrisch bestimmt. Die kegelförmigen Gefäße von etwa 18 ml Inhalt wurden mit 2,0 - 2,5 ml Zellsuspension in 0,05 m Citrat oder KH_2PO_4 gefüllt. Als Gasphase diente N_2 + 5 % CO_2. Die Temperatur betrug 30 Grad C, die Schüttelfrequenz 200/min., die Amplitude 1 cm (Protokoll 2).

Protokoll 2

Hefezellen wurden in 3 Parallelansätzen gezüchtet. Die Medien enthielten bei sonst gleicher Zusammensetzung 0,1, 0,2 und 1,0 mM PO_4/l. Zu verschiedenen Zeiten wurden Zellen entnommen und in ca. 1 %iger Suspension zur Manometrie gebracht.
Die Gefäße enthielten:

	1	2	3	Thermob.
Puffer	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Zellsusp.	0,5 "	0,5 "	0,5 "	-

Manometerablesungen:

t (min)	1	2	3	Thermob.
0	107,0	102,0	117,0	155,5
10	135,0	126,0	148,0	156,5
20	161,0	148,0	177,0	157,5
30	185,0	168,5	204,0	158,0
40	208,0	188,0	230,0	158,0

Berechnung der $Q_{CO_2}^{N_2}$:

	1	2	3
k_{CO_2}	1,707	1,776	1,766
mm Brodie/h	148,5	124,5	165,8
mg Prot./Gef.	0,409	0,401	0,417
mm^3 CO_2/mg Prot.·h	620	550	700

Bestimmung der Hexosemonophosphataseaktivität an der intakten Zelle

Die Aktivität der Hexosemonophosphatase wurde nach Kiesow (20) bestimmt. Dabei werden Hefezellen aerob mit 2-Desoxyglukose beladen, dann wird durch N_2 anaerob gemacht und das Wiedererscheinen des Zuckers im Medium gemessen. Die Anfangsgeschwindigkeit des Zuckeraustritts ist ein Maß für die Hexosemonophosphataseaktivität.
Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen und in etwa 1 %iger Suspension in 0,05 m KH_2PO_4, 0,1 m Glukose und 0,001 m Mg^{++} eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert, um sie gleichmäßig mit Phosphat zu beladen, Dann wiederum gewaschen und in 0,05 m KH_2PO_4 suspendiert, so daß die Suspensionen 13,2 bzw. 12,0 mg Protein/ml enthielten.
Die Suspensionen wurden mit Luft durchströmt. Die Reaktion wurde mit ca. 100 mg % 2-Desoxyglukose gestartet. Nach 60 Minuten wurde die durchströmende Luft durch N_2 + 5 % CO_2 ersetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben von 0,5 ml entnommen, die Zellen scharf abzentrifugiert und 0,1 ml des Überstands in 1,0 ml Perchlorsäure gegeben. 2-Desoxyglukose wurde enzymatisch mit Glukoseoxydase, Peroxydase und o-Dianisidinhydrochlorid bestimmt, wie sie von der Firma C.F. Boehringer & Söhne Mannheim als Testsatz zur Blutzuckerbestimmung geliefert werden. Die Reaktion läuft mit Desoxyglukose langsamer ab als mit Glukose. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Extinktion bei 436 nm gemessen (Protokoll 3).

Protokoll 3

0,2 ml der Probe in Perchlorsäure wurden zur enzymatischen 2-Desoxyglukose-Bestimmung eingesetzt. Als Standard dienten 0,2 ml einer 10 %igen 2-Desoxyglukoselösung entsprechend 20 γ 2-Desoxyglukose. Δ E des Standards: 0,156

	Phosphatase repr.		Phosphatase derepr.	
t (min.)	Δ E	mg % 2-DG	Δ E	mg % 2-DG
0	0,121	85,3	0,114	80,4
15	0,051	36,0	0,049	34,6
30	0,048	33,8	0,041	28,9
45	0,044	31,0	0,037	26,1
60	0,031	21,8	0,034	24,0
65	0,037	26,1	0,038	26,8
70	0,039	27,5	0,047	33,2
75	0,040	28,2	0,046	32,4
90	0,053	37,4	0,058	41,0
105	0,055	38,3	0,065	45,8

Bestimmung des intracellulären Phosphats und Polyphosphats

Die Bestimmung des intracellulären Phosphats und Polyphosphats erfolgte nach Weimberg und Orton (44). 10 %ige Zellsuspensionen in Wasser wurden 10 Minuten im kochenden Wasserbad extrahiert. Das Orthophosphat wurde nach Fiske und Subbarow (8) bestimmt. Um die Polyphosphate zu erfassen, wurde der Heißwasserextrakt mit dem gleichen Volumen 3 n HCl 7 Minuten im kochenden Wasserbad hydrolysiert und anschließend wieder das Phosphat bestimmt. Das alkaliextrahierbare Phosphat wurde nach der Empfehlung von Weimberg und Orton (44) dabei vernachlässigt (Protokoll 4).

Protokoll 4

Verhalten des intracellulären Ortho- und Polyphosphats während des aeroben Wachstums unter Phosphatmangel. Orthophosphat wurde in 0,5 ml des Heißwasserextrakts, Gesamtphosphat in 0,5 ml einer 1 : 5 Verdünnung des Säurehydrolysats bestimmt. Die Extinktion wurde im Photometer Eppendorf bei λ = 578 nm und d = 2,001 cm gemessen. Proteinbestimmung nach Lowry et al. (25).

Wachstumszeit (h)	Δ E vor Hydrolyse		Δ E nach Hydrolyse		Protein (mg/ml Susp.)
0	1,265	1,260	0,330	0,310	7,75
3,5	0,356	0,356	0,067	0,062	5,64
5,5	0,154	0,149	0,032	0,035	5,45
23,0	0,145	0,150	0,040	0,039	9,12

PO_4 (mM/l Zellen) vor Hydrolyse	PO_4 (mM/l Zellen) nach Hydrolyse	Poly-PO_4 (mM/l Zellen)
58,20	140,50	82,30
22,60	41,20	18,60
9,96	22,22	12,26
5,79	15,65	9,86

Zusammenfassung

Die reprimierbare saure Phosphatase ist fast ausschließlich auf der Oberfläche der Hefezelle lokalisiert. Im Zellinneren finden sich nur geringe Enzymmengen, die dort synthetisiert und von Membranen eingeschlossen zur Oberfläche transportiert werden.

Das Wirkungsoptimum der sauren Phosphatase liegt bei p_H 3,4.

Das Enzym hat keinen Einfluß auf die Gärungsgröße und die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Es ist nicht identisch mit der intracellulär wirksamen Hexosemonophosphatase.

Der Corepressor der reprimierbaren sauren Hefephosphatase ist das intracelluläre Polyphosphat.

Die saure Phosphatase dient der Hefezelle dazu, Phosphatester des Mediums zu spalten und unter Bedingungen des Orthophosphatmangels als Phosphatquelle nutzbar zu machen.

Der Norddeutschen Hefeindustrie Hamburg danken wir für die großzügige Bereitstellung des Zellmaterials.
Von den Firmen Hoechst und Pfizer wurden wir mit Antibiotika-Spenden unterstützt, die Firma C.F. Boehringer & Söhne Mannheim überließ uns freundlicherweise ATP und Hexokinase. Allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Literaturverzeichnis

1. H.u.E. Albers, Z.phys.Chem. 235 47 (1935)
2. M.A. Andersch, A. Szczypinski, Am.J.clin.Path. 17 571 (1947)
3. E.R. Blakley, P.D. Boyer, BBA 16 576 (1955)
4. M. Burger, L. Hejmova, A. Kleinzeller, Biochem.J. 71 233 (1959)
5. C.W. Chung, W.J. Nickerson, JBC 208 395 (1954)
6. C. de Duve, in "Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle", Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1963, S. 209
7. E. Englesberg, J.A. Watson, P.A. Hoffee in Cold spring harbor symposia on quantitative biology Vol.26, p.261, The biological laboratory, Cold spring harbor, L.I. New York 1961
8. C.H. Fiske, Y. Subbarow, JBC 66 375 (1925)
9. J. Giaja, Compt.Rend.Soc.Biol. 77 2 (1913)
10. A. Gottschalk, Biochem.J. 40 621 (1946)
11. Th. Günther, W. Kattner, H.J. Merker, Exp.Cell Res. 45 133 (1966)
12. Th. Günther, W. Kattner, Z.phys.Chem. 347 272 (1966)
13. C.F. Heredia, F. Yen, A. Sols, B.B.Res.Com. 10 14 (1963)
14. B.v.Hofsten, BBA 48 171 (1961)
15. B.v.Hofsten, J. Porath, BBA 64 1 (1962)
16. H. Holzer, F. Lynen, Ann.Chem. 569 138 (1950)
17. T. Horiuchi, S. Horiuchi, D. Mizuno, Nature 183 1529 (1959)
18. L. Kiesow, Z.Naturforsch. 14b 224 (1959)
19. L. Kiesow, Z.Naturforsch. 14b 490 (1959)
20. L. Kiesow, Z.Naturforsch. 14b 492 (1959)
21. L. Kiesow, S. Döge, Z.Naturforsch. 16b 576 (1961)
    L. Kiesow, S. Döge, Z.Naturforsch. 17b 390 (1962)
22. W. Kundig, F.D. Kundig, B. Anderson, S. Roseman, JBC 241 3243 (1966)

23. M.H. Kuo, H.J. Blumenthal, BBA 52 13 (1961)
24. K. Letnansky, Biochem.Z. 341 74 (1964)
25. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, JBC 193 265 (1951)
26. F. Lynen, R. Königsberger, Ann.Chem. 573 60 (1951)
27. W.L. McLellan, J.O. Lampen, BBA 67 324 (1963)
28. B. Pauwels, R. Reijnen, BBA 93 659 (1964)
29. J.J. Rae, E.V. Eastcott, JBC 136 443 (1940)
30. D. Rogers, F.J. Reithel, ABB 89 97 (1960)
31. A. Rothstein, R. Meier, J.Cell.Comp.Physiol. 34 97 (1949)
32. A. Schaeffner, E. Bauer, Z.phys.Chem. 232 66 (1935)
33. A. Schaeffner, F. Krumey, Z.phys.Chem. 243 149 (1936)
    A. Schaeffner, F. Krumey, Z.phys.Chem. 255 145 (1938)
34. G. Schmidt, M. Laskowski in P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, The Enzymes Vol.V p.3 Academ.Press New York and London 1961
35. G. Schmidt, G. Bartsch, M.C. Laumont, T. Herman, M. Liss, Biochem. 2 126 (1963)
36. W. Schuchardt, Biochem.Z. 283 433 (1935)
    W. Schuchardt, Biochem.Z. 285 448 (1936)
37. A. Sols, BBA 20 62 (1956)
38. H. Suomalainen, M. Linko, E. Oura, BBA 37 482 (1960)
39. G.J.M. Tonino, E.P. Steyn-Parvé, BBA 67 453 (1963)
40. A. Torriani, BBA 38 460 (1960)
41. H. Urbahn, J. Schulz, U. Hartwig, E. Hofmann, Biochem.Z. 340 522 (1964)
42. O. Warburg, K. Gawehn, A.-W. Geissler, Z.Naturforsch. 13b 61 (1958)
43. R. Weimberg, W.L. Orton, J.Bact. 88 1743 (1964)
44. R. Weimberg, W.L. Orton, J.Bact. 89 740 (1965)
45. R. Weimberg, W.L. Orton, J.Bact. 90 82 (1965)
    R. Weimberg, W.L. Orton, J.Bact. 91 1 (1966)

Ich danke Herrn Professor Dr. med., Dr. rer.nat. E.Schütte und besonders Herrn Priv. Doz. Dr. med. Theodor Günther für die Beratung bei der Wahl des Themas und die großzügige Unterstützung der experimentellen Arbeiten.

Lebenslauf

Als Sohn des Versicherungsinspektors Heinrich Kattner und seiner Ehefrau Gertrud geb. Hahn wurde ich, Winfried Kattner, am 14.5.1934 in Breslau geboren.
Nach vierjähriger Volksschulzeit wurde ich in das Gymnasium Fridericianum in Glogau, wohin mein Vater inzwischen als Generalagent seiner Firma versetzt worden war, aufgenommen. Die Nachkriegszeit verbrachte ich mit meinen Eltern als Ostflüchtling in Pirna in Sachsen, in Cottbus in der Niederlausitz und bei Apolda in Thüringen. In Apolda konnte ich wieder eine Schule im Rahmen des damals in der sowjetischen Besatzungszone geltenden Schulgesetzes besuchen. Als mein Vater mit dem Wiederaufbau der Bezirksdirektion Berlin seiner Gesellschaft beauftragt wurde, kam ich im Frühjahr 1949 nach Berlin. Hier besuchte ich die Malvida v. Meysenbug-Schule bis zum Abitur, das ich 1953 ablegte. Ich wurde an der Freien Universität Berlin für das Fach Medizin eingeschrieben und bestand 1955 die Ärztliche Vorprüfung, 1959 das Staatsexamen. 1957 heiratete ich die Studentin der Pharmazie Ingrid Schenck.

Als Medizinalassistent arbeitete ich im Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität, wo ich bereits während des Studiums als studentische Hilfskraft tätig gewesen war, in der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität, auf der chirurgischen Abteilung des Städtischen Behringkrankenhauses und der geburtshilflich-gynaekologischen Abteilung des Dominicus-Krankenhauses in Berlin-Hermsdorf. 1961 wurde mir die Bestallung als Arzt erteilt. Ich erhielt eine chirurgische Fachausbildung im Städtischen Behringkrankenhaus bei Herrn Privatdozent Dr. Dohrmann und erwarb 1965 die Facharztanerkennung

für das Fach Chirurgie. Im September 1965 kehrte ich noch einmal in das Physiologisch-chemische Institut der Freien Universität zurück, um Gelegenheit zu wissenschaftlicher Arbeit zu haben und um meine vor längerer Zeit dort begonnene Dissertation fertigstellen zu können. Mein Doktorvater wurde Herr Privatdozent Dr. Günther.
Seit dem 1. Oktober 1966 bin ich mit der Wahrnehmung der Aufgaben eines wissenschaftlichen Assistenten an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität im Städtischen Krankenhaus Westend beauftragt.

Berlin, den 26. September 1967

Fred Höpfner · Dissertationsdruck · 1 Berlin 12 · Pestalozzistr. 105 · Tel. 318885